

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/54, 15/82, 9/10, A01H 5/00	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04103
		(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01125

(22) Date de dépôt international: 18 juillet 1996 (18.07.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/08979 19 juillet 1995 (19.07.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEBRUN, Michel [FR/FR]; 224, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrègue, F-69009 Lyon (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-D'Or (FR).

(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: MUTATED 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE, GENE CODING FOR SAID PROTEIN AND TRANSFORMED PLANTS CONTAINING SAID GENE

(54) Titre: 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE MUTÉE, GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE ET PLANTES TRANSFORMÉES CONTENANT CE GENE

(57) Abstract

A mutated glyphosate resistance gene of 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) including at least one substitution of threonine 102 by isoleucine, and useful for producing glyphosate-resistant transformed plants, is disclosed.

(57) Abrégé

Gène de résistance au glyphosate. 1) Gène muté de résistance au glyphosate. 2) Gène EPSPS comprenant au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'Isoleucine. 3) Il est utilisable pour l'obtention de plantes transformées résistantes au glyphosate.

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 7991-086-99

SERIAL NUMBER: 09/685,403

REFERENCE: BS



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/54, 15/82, 9/10, A01H 5/00	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04103	(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
---	----	--	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01125

(22) Date de dépôt international: 18 juillet 1996 (18.07.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/08979 19 juillet 1995 (19.07.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEBRUN, Michel [FR/FR]; 224, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrègue, F-69009 Lyon (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-D'Or (FR).

(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: MUTATED 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE, GENE CODING FOR SAID PROTEIN AND TRANSFORMED PLANTS CONTAINING SAID GENE

(54) Titre: 5-ENOL PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE MUTEE, GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE ET PLANTES TRANSFORMEES CONTENANT CE GENE

(57) Abstract

A mutated glyphosate resistance gene of 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) including at least one substitution of threonine 102 by isoleucine, and useful for producing glyphosate-resistant transformed plants, is disclosed.

(57) Abrégé

Gène de résistance au glyphosate. 1) Gène muté de résistance au glyphosate. 2) Gène EPSPS comprenant au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine. 3) Il est utilisable pour l'obtention de plantes transformées résistantes au glyphosate.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

5-énol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutée, gène codant pour cette protéine et plantes transformées contenant ce gène.

La présente invention concerne une nouvelle 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (ou EPSPS), qui présente une tolérance accrue vis à vis des herbicides inhibiteurs compétitifs vis à vis du phosphoenolpyruvate (PEP) de l'activité EPSPS. Cette EPSP synthase plus tolérante présente au moins une substitution "Thréonine par Isoleucine". Elle concerne également un gène codant pour une telle protéine, des cellules végétales transformées par des constructions gènes chimères contenant ce gène, les plantes régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisement utilisant ces plantes transformées.

Le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent essentiellement comme inhibiteurs compétitifs de la 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EC 2.5.1.19) ou EPSPS vis à vis du PEP(phosphoenolpyruvate). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante où ils s'accumulent dans les parties à croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant l'altération jusqu'à la destruction des plantes sensibles.

L'EPSPS plastidiale, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, qui est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur cytoplasmique puis importée dans les plastes où elle s'accumule sous sa forme mature.

La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Etant donné le mode d'action du glyphosate et le degré de tolérance au glyphosate du produit des gènes utilisés, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastes.

Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate) après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour obtenir la plus grande fiabilité dans l'emploi de ces plantes en conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire d'origine végétale capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une

plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes ou des semences.

La présente invention a pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue aux herbicides de la famille des phosphonométhylglycines par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides.

L'invention a également pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription: une zone promotrice, éventuellement une zone peptide de transit, une séquence d'un gène codant pour une enzyme de tolérance au glyphosate et une zone signal de polyadénylation non traduite en 3', caractérisé en ce que le gène de tolérance au glyphosate comporte, par rapport au gène dont il est dérivé, une substitution "Thréonine 102 par Isoleucine" dans la zone "aroA"(EPSPS). De manière préférée, elle comprend en outre, dans la même zone une substitution "Proline 106 par Sérine". Ces substitutions peuvent être introduites, ou être présentes, dans une séquence d'EPSPS d'origine quelconque: notamment végétale, bactérienne, d'algues ou de champignon.

Les peptides de transit utilisables dans la zone de peptide de transit peuvent être en soi connus d'origine végétale, par exemple issus de maïs, de tournesol, de pois, de tabac ou autres. Le premier et le second peptide de transit peuvent être identiques, analogues ou différents. Ils peuvent en outre comprendre chacun une ou plusieurs unités peptide de transit selon la demande de brevet européen EP 0 508 909. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le relargage d'une protéine mature et native, et en particulier l'EPSPS mutée ci-dessus, avec une efficacité maximale dans le compartiment plasmidique.

La zone promotrice du gène chimère selon l'invention peut être composée avantageusement d'au moins un promoteur ou un fragment d'un promoteur de gène s'exprimant naturellement dans les plantes...(tubuline, introns actine, histone).

Le signal de terminaison de la transcription non traduite en 3' du gène chimère peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne telle que celle du gène de la nopaline synthase, ou végétale telle que celle du gène histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana* selon la demande de brevet européen (demande européenne 633 317).

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles ci-dessus, entre autres une zone intermédiaire non traduite (linker), qui peut être localisée entre les deux régions transcrites décrites ci-dessus. Cette zone intermédiaire peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne, virale ou végétale.

Isolement d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs:

Les différentes étapes, qui ont conduit à l'obtention de l'ADNc d'EPSPS de maïs, qui a servi de substrat à l'introduction des deux mutations, sont décrites ci-dessous. Toutes les opérations décrites ci-dessous sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al., publiés par Greene Publishing Associates et Wiley-Interscience (1989) (Par la suite, les références à des protocoles décrits dans cet ouvrage seront notées "réf. CPMB"). Les opérations concernant l'ADN, qui ont été effectuées selon les protocoles décrits dans cet ouvrage sont, en particulier les suivantes: ligation de fragments d'ADN, traitements par l'ADN polymérase de Klenow et la T4 ADN polymérase, préparation d'ADN de plasmides et de bactériophages λ soit en mini-préparation soit en maxi préparation, analyses d'ADN et d'ARN respectivement selon les techniques de Southern et Northern. D'autres méthodes décrites dans cet ouvrage ont été suivies, et seules les modifications ou ajouts significatifs à ces protocoles ont été décrits ci-dessous.

Exemple 1:

1. Obtention d'un fragment d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*

a) deux oligonucleotides 20-mers de séquences respectives:

- GCTCTGCTCATGTCTGCTCC -3'

5'- GCCCGCCCTTGACAAAGAAA- 3'

ont été synthétisés à partir de la séquence d'un gène d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Ces deux oligonucleotides sont respectivement en position 1523 à 1543 et 1737 à 1717 de la séquence publiée et en orientation convergente.

b) l'ADN total d'*Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) a été obtenu chez Clontech (référence catalogue: 6970-1)

On mélange 50 nanogrammes(ng) d'ADN avec 300ng de chacun des oligonucleotides et soumis à 35 cycles d'amplification avec un appareil Perkin-Elmer 9600, dans les conditions de milieu standard pour l'amplification préconisées par le fournisseur. Le fragment de 204pb résultant constitue le fragment d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*.

2. construction d'une bibliothèque d'un ADNc à partir d'une ligne cellulaire de maïs S.

- a) On broye 5 g de cellules filtrées dans l'azote liquide et les acides nucléiques totaux extraits selon la méthode décrite par Shure et al. avec les modifications suivantes:
- le pH du tampon de lyse est ajusté à $\text{pH} = 9,0$;
 - après la précipitation par l'isopropanol, le culot est repris dans l'eau et après dissolution, ajusté à 2,5 M LiCl. Après incubation pendant 12 h à $^{\circ}\text{C}$, le culot de la centrifugation d 15 min. à 30000g à 4°C est resolubilisé. L'étape de précipitation par LiCl est alors répétée. Le culot resolubilisé constitue la fraction ARN des acides nucléiques totaux.
- b) La fraction ARN-polyA⁺ de la fraction ARN est obtenue par chromatographie sur colonne oligo-dT cellulose telle que décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology".
- c) Synthèse d'ADNc double brin à extrémité synthétique EcoRI: elle est réalisée en suivant le protocole du fournisseur des différents réactifs nécessaires à cette synthèse sous forme d'un kit: le "copy kit" de la société In Vitrogen.
- 15 I aux oligonucleotides simples brins et partiellement complémentaires de séquences respectives:
- 5'- AATTCCCGGG -3'
 - 5'- CCCGGG- 3' (ce dernier étant phosphorylé)
- sont ligués avec les ADNc double brin à extrémités franches.
- 20 Cette ligation des adaptateurs résulte en la création de sites Sma I accolés aux ADNc double brin et EcoRI sous forme cohésive à chaque extrémité des ADNc double brin.
- d) Création de la bibliothèque:
- Les ADNc présentant à leurs extrémités les sites artificiels cohésifs EcoRI sont ligués avec le ADNc du bactériophage λ gt10 coupé par EcoRI et déphosphorylé
- 25 selon le protocole du fournisseur Naew England Biolabs.
- Une aliquote de la réaction de ligation a été encapsidée *in vitro* avec des extraits d'encapsulation: Gigapack Gold selon les instructions du fournisseur, cette librairie a été titrée en utilisant la bactérie *E.coli* C600. la librairie ainsi obtenue est amplifiée et stockée selon les instructions du même fournisseur et constitue la
- 30 librairie de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS.

3. Criblage de la bibliothèque de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS avec la sonde EPSP d'*Arabidopsis thaliana*:

- Le protocole suivi est celui de "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel, F.M. et al, publiés par Greene Publishing Associates et Wiley-Interscience (1987)(C1.1.1). En bref, environ 10^6 phages recombinants sont étalés sur boîte LB à une densité moyenne de 100 phages / cm^2 . Les plaques de lyses sont répliqués en doubles sur membrane H-bond N d'Amersham.

h) L'ADN a été fixé sur les filtres par traitement UV 1600kJ (Stratalinker de Stratagene). Les filtres ont été préhybridés dans: 6xSSC/0,1%SDS/0,25 lait écrémé pendant 2h à 65°C. La sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été marquée au ^{32}P -dCTP par "random-priming" selon les instructions du fournisseur (Kit Ready to Go de Pharmacia). L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 10^8 cpm par μg de fragment. Après dénaturation pendant 5 min à 100°C, la sonde est ajoutée dans le milieu de préhybridation et l'hybridation est poursuivie pendant 14 heures à 55°C. Les filtres sont fluorographiés 48h à -80°C avec un film KodakXAR5 et des écrans renforceurs Hyperscreen RPN d'Amersham. L'alignement des spots positifs sur le filtre avec les boîtes d'où ils sont issus permet de prélever, sur la boîte, des zones correspondant aux phages présentant une réponse d'hybridation positive avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étape d'étalement, transfert, hybridation, récupération est répétée jusqu'à ce que tous les spots de la boîte des phages successivement purifiés se révèlent positifs à 100% en hybridation. Une plage de lyse par phage indépendant est alors prélevée dans du milieu λ diluant (Tris-Cl pH= 7,5; MgSO_4 10mM; NaCl 0,1M; gélatine 0,1%), ces phages en solution constituant les clones positifs de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

4. Préparation et analyse de l'ADN des clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

On ajoute environ $5 \cdot 10^8$ phages à 20 ml de bactéries C600hfl à 2 OD 600nm/ml et incubés 15 minutes à 37°C. Cette suspension est alors diluée dans 200ml de milieu de croissance des bactéries dans un Erlen de 1l et agitée dans un agitateur rotatif à 250 rpm. La lyse est constatée par clarification du milieu, correspondant à la lyse des bactéries turbides et se produit après environ 4 h d'agitation. Ce surnageant est alors traité comme décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN obtenu correspond aux clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

Un à deux μg de cet ADN sont coupés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LG1A/TB1 (cf. CPMB) à 0,8%. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone présentant un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* et contenant le plus long fragment EcoRI a une taille estimée sur gel à environ 1,7kpb.

5. Clonage du clone pRPA-ML-711:

Dix µg de l'ADN du clone phagique contenant l'insert de 1,7kpb sont digérés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert de 1,7kpb est excisé du gel par coloration BET et le fragment est traité à la β agarase selon le protocole du fournisseur New England Biolabs. L'ADN purifié du fragment de 1,7kpb est ligué à 12°C pendant 14h avec l'ADN du plasmide pUC 19 (New England Biolabs) coupé par EcoRI selon le protocole de ligation décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Deux µl du mélange de ligation ci-dessus sont utilisés pour la transformation d'une aliquote d'E.coli DH10B électro compétentes ; la transformation se fait par électroporation en utilisant les conditions suivantes: le mélange de bactéries compétentes et de milieu de ligation est introduit dans une cuvette d'électroporation d'épaisseur 0,2cm (Biorad) préalablement refroidie à 0°C. Les conditions physiques de l'électroporation utilisant un électroporateur de marque Biorad sont 2500 Volts, 25 µFarad et 200 Ω. Dans ces conditions, le temps de décharge moyen de condensateur est de l'ordre de 4,2 millisecondes. Les bactéries sont alors reprises dans 1 ml de milieu SOC (réf. CPMB) et agitées pendant 1 heure à 200 rpm sur un agitateur rotatif dans des tubes Corning de 15 ml. Après étalement sur milieu LB/agar supplémenté à 100 µg/ml de carbéniciline, les mini-préparations des clones bactériens ayant poussé après une nuit à 37°C est réalisée selon le protocole décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Après digestion par EcoRI de l'ADN et séparation en électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%, les clones présentant un insert de 1,7kpb sont conservés. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone plasmidique présentant un insert de 1,7kpb et hybridant avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été préparé à plus grande échelle et l'ADN résultant de la lyse des bactéries purifié sur gradient de CsCl ainsi que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN purifié a été partiellement séquencé avec un kit Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant comme amorces, les amorces universelles de M13 directes et inverses commercialisées chez le même fournisseur. La séquence partielle réalisée couvre environ 0,5 kpb de la séquence dérivée en acides aminés dans la région de la protéine mature (environ 50 résidus d'acides aminés) présente une identité de 100% avec la séquence aminée correspondante de l'EPSPS mature de maïs décrite dans le brevet américain USP 4 971 961. Le clone correspondant à un fragment EcoRI de 1,7kpb de l'ADN de l'EPSP de la souche cellulaire de maïs BMS a été nommé pRPA-ML-711. La séquence complète de ce clone a été réalisée sur les deux brins en utilisant le protocole du kit Pharmacia et en

synthétisant des oligonucléotides complémentaires et de direction opposée tous les 250 pb environ. La séquence complète de ce clone de 1713 pb obtenue est présentée par SEQ ID N° 1.

5 **6. Obtention du clone pRPA-ML-715:**

L'analyse de la séquence du clone pRPA-ML-711 et en particulier la comparaison de la séquence d'acides aminés dérivés avec celle de maïs montre une extension de séquence de 92 pb en amont du codon GCG codant pour l'Alanine NH₂-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908). De même une extension de 288 pb en aval du codon AAT codant pour l'asparagine COOH-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908) est observée. Ces deux parties pourraient correspondre, pour l'extension NH₂-terminale à une portion de la séquence d'un peptide d'import pour la localisation plastidiale et pour l'extension COOH-terminale à la région 3' non traduite de l'ADNc.

15 Afin d'obtenir un ADNc codant pour la partie mature de l'ADNc de l'EPSPS de maïs, telle que décrite dans l'USP 4 971 908, les opérations suivantes ont été réalisées:

a) **Élimination de la région 3' non traduite: construction de pRPA-ML-712:**

Le clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction AseI et les extrémités résultant de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I selon le protocole décrit dans CPMB. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces opérations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 1%.

Le fragment de gel contenant l'insert "AseI-extrémités franches/SacII" de 0,4 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. L'ADN du clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII située dans le polylinker du vecteur de clonage pUC19 et les extrémités résultant de cette coupure ont été rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,7%.

Le fragment de gel contenant l'insert HindIII-extrémités franches/SacII de environ 3,7kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus.

Les deux inserts ont été ligués, et 2 µl du mélange de ligation ont servi à transformer *Escherichia coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5.

35 L'analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite pour pRPA-ML-711. Un des clones plasmidique retenu contient un insert EcoRI-HindIII de 3,4 kpb environ. La séquence des extrémités terminales de ce clone révèle que

l'extrémité 5' de l'insert correspond exactement à l'extrémité correspondante de pRPA-ML-711 et que l'extrémité 3' terminale présente la séquence suivante:

"5'-...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3'".

La séquence soulignée correspond au codon de l'acide aminé COOH-terminal asparagine, le codon suivant correspondant au codon stop de la traduction. Les nucléotides en aval correspondent à des éléments de séquence du polylinker de pUC19. Ce clone comprenant la séquence de pRPAML-711 jusqu'au site de terminaison de la traduction de l'EPSPS mature de maïs et suivie de séquences du polylinker de pUC 19 jusqu'au site HindIII a été nommé pRPA-ML-712.

10 **c) Modification de l'extrémité 5' de pRPA-ML-712: construction de pRPA-ML-715**

Le clone pRPA-ML-712 a été coupé par les enzymes de restrictions PstI et HindIII. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert PstI/EcoRI de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été utilisé en ligation en présence de quantité équimoléculaire de chacun des deux oligonucléotides partiellement complémentaires, de séquence:

Oligo 1: 5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2: 5'-GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC-3'

et qu'en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par les enzymes de restrictions BamHI et HindIII.

Les milieux du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit ci-dessus au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones 25 présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence de l'extrémité 5' terminale du clone retenu révèle que la séquence ADN dans cette région est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à BamHI, suivi de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage, suivi du reste de la séquence présente dans pRPAML-712. Ce clone a été nommé pRPA-ML-713. Ce clone présente un 30 codon d'alanine ATG inclus dans un site NcoI en amont du codon Alanine N-terminal de l'EPSPS mature. De plus, les codons alanine et glycine de l'extrémité N-terminale ont été conservés, mais modifiés sur la troisième base variable : GCGGGT initial donne GCGGGT modifié.

Le clone pRPA-ML-713 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII et les 35 extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de la polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert "HindIII-extrémités

fragment "SacI" de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par l'enzyme de restriction XbaI et les extrémités de cette coupure rendues compatibles par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence des extrémités terminales du clone retenu révèle que la séquence ADN est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à SacI, suivie de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage déletée des 4 pb GATCC de l'oligonucléotide 1 décrit ci-dessus, suivi du reste de la séquence présente dans pRPA-ML jusqu'au site HindIII et séquence du polylinker de pUC19 de XbaI à HindIII. Ce clone est nommé pRPA-ML-715.

15

Obtention d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs mutée

Toutes les étapes de mutagenèse ont été réalisées avec le U.S.E. mutagenesis kit de Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur. Le principe de ce système de mutagenèse est le suivant: l'ADN plasmidique est dénaturé par la chaleur et réassocié en présence d'un excès molaire d'une part de l'oligonucléotide de mutagenèse, et d'autre part d'un oligonucléotide permettant d'éliminer un site d'enzyme de restriction unique présent dans le polylinker. Après l'étape de réassociation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée sous l'action de la T4 ADN polymérase en présence de T4 ADN ligase et de protéine du gel dans un tampon approprié fourni. Le produit de synthèse est incubé en présence de l'enzyme de restriction, dont le site est supposé avoir disparu par mutagenèse. La souche d'*E. coli* présentant, en particulier, la mutation mutS est utilisée comme hôte pour la transformation de cet ADN. Après croissance en milieu liquide, l'ADN plasmidique total est préparé, incubé en présence de l'enzyme de restriction utilisée précédemment. Après ces traitements, la souche d'*E. coli* DH10B est utilisée comme hôte pour la transformation. L'ADN plasmidique des clones isolés est préparé et la présence de la mutation introduite vérifiée par séquençage.

Identification de sites ou de séquence sans incidence a priori sur le caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPS synthase: élimination d'un site NcoI interne de pRPA-ML-715.

La souche de pRPA-ML-715 est numérotée arbitrairement en plaçant la première base de la séquence Alanine N-terminal GCC en position 1. Cette séquence présente un site NcoI en position 1217. L'oligonucléotide de modification du site présente la séquence :

5'-...ACAG...ATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Après séquençage selon les références données ci-dessus, la séquence lue après mutagenèse correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé. Le site NcoI a bien été éliminé et la traduction en acides aminés dans cette région conserve la séquence initiale présente sur pRPA-ML-715.

5 Le clone a été nommé pRPA-ML-716.

La séquence de 1340 bp de ce clone est présentée SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3.

(b) Modifications de séquence permettant l'augmentation du caractère de résistance à l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase.

10 Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

1. Mutation Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

2. Mutation Pro 106 \Rightarrow Ser.

15 5'-AATGCTGGAAGTCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

3. Mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-CTTGGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

20 4. Mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

5'-GGAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

Après séquençage, la séquence lue après mutagenèse sur les trois fragments mutés est identique à la séquence de l'ADN parental pRPA-ML-716 à l'exception de la région mutagenisée qui correspond à celle des oligonucléotides de mutagenèse utilisés. Ces clones ont été nommés : pRPA-ML-717 pour la mutation Thr 102 \Rightarrow Ile, pRPA-ML-718 pour la mutation Pro 106 \Rightarrow Ser, pRPA-ML-719 pour les mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile, pRPA-ML-720 pour les mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

30 La séquence de 1340 bp de pRPA-ML-720 est présentée SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5.

L'insert NcoI-HindIII de 1395 pb est à la base de toutes les constructions utilisées pour la transformation des plantes pour l'introduction de la résistance aux herbicides inhibiteurs compétitifs de l'EPSPS et en particulier la résistance au glyphosate. Cet insert sera nommé dans les figures descriptives "le double mutant de l'EPSPS de maïs".

35

Exemple 2:

Traitements au glyphosate des différents mutants in vitro.

Extraction de l'EPSP synthase.

Les différents gènes d'EPSP synthases sont introduits sous forme d'une cassette NcoI-HindIII dans le vecteur plasmidique pTrc99a (Pharmacia, ref : 27-5007-01) coupé par NcoI et Hind III. Les *E. coli* DH10B recombinantes surexprimant les différents EPSP synthases sont soniquées dans 40 ml de tampon par 10 g de cellules culottées et lavées avec ce même tampon (tris HCl 200 mM pH 7,8, mercaptoethanol 50 mM, EDTA 5 mM et PMSF 1 mM), auxquelles on ajoute 1 g de polyvinylpyrrolidone. La suspension est agitée pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugée 20 minutes à 27000g et 4°C.

Le surnatant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 40% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 20 minutes à 27000g et 4°C.

10 Le précipité surnatant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 30 minutes à 27000g et 4°C. L'EPSP synthase, présente dans ce culot protéique, est reprise dans 1 ml de tampon (tris HCl 200 mM pH 7,8 et mercaptoethanol 50 mM). Cette solution est dialysée une nuit contre deux litres de ce même tampon à 4°C.

15 2.3.3. Activité enzymatique.

L'activité de chaque enzyme ainsi que sa résistance au glyphosate est mesurée in vitro sur 10 minutes à 30°C dans le mélange réactionnel suivant: acide maléique 100 mM pH 5,6, phosphoenolpyruvate 1 mM, shikimate-3-phosphate 3 mM (préparé selon Knowles P.F. et Sprimeaux, 1970, Methods in Enzymol 17A, 351-352 à partir de *Aerobacter aerogenes* strain 39 (125597) et fluorure de potassium 10 mM. L'extrait enzymatique est ajouté au dernier moment après l'addition de glyphosate dont la concentration finale varie de 0 à 20 mM.

L'activité est mesurée par dosage du phosphate libéré selon la technique de Tausky H.A. et Shorr, 1952, J. Biol. Chem. 202, 675-685.

25 Dans ces conditions, l'enzyme sauvage (WT) est inhibée à 85% dès la concentration de 0,12 mM de glyphosate. A cette concentration, l'enzyme mutante connue Ser106 n'est inhibée qu'à 50%. Les autres mutants Ile102, Ile102/Ser106, Ala101/Ile102 ne sont pas ou peu inhibés.

Il faut multiplier la concentration de glyphosate par dix, soit 1,2 mM, pour inhiber l'enzyme mutante connue Ala101. Or, les mutants Ile102/Ser106, Ala/Ile et Ala n'étant toujours pas inhibés.

30 Il faut donc multiplier l'activité des mutants Ala/Ile et Ala n'est pas inhibée jusqu'à des concentrations de 12 mM de glyphosate, et que celle du mutant Ile102/Ser106 n'est pas réduite jusqu'à une concentration en glyphosate est multipliée par 2, soit 20 mM.

35 2.3.4. Résultats.

Résultats obtenus sur les plantes de tabac transformées.

1. Introduction.

Le vecteur pRPA-RD-173 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EH-10 (Hood et al.,1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari et al.,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al.(1985).

1. Régénération.

- 5 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et transformées selon la technique des disques foliaires (Schoof, 1985, Vol 227, p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend
- 10 l'incubation des pousses sur un milieu additionné de 30g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l de naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours en culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose mais ne contenant pas d'auxone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu
- 15 d'environnement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'auxone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2. Résistance au glyphosate.

- Les plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction
- 20 pRPA-RD-173. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de RoundUp correspondant à 0,8kg de matière active glyphosate par hectare.
- Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaines après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par la construction pRPA-RD-173 présentent une très bonne tolérance alors que les plantes
- 25 témoins non transformées sont complètement détruites.
- Les résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène codant pour l'inactivation pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

3. Conclusion

- 30 1. Régénération et sélection de cellules de maïs.

2. Les cellules de maïs BMS (Black Mexican Sweet) en phase exponentielle de croissance ont été bombardées avec la construction pRPA-RD-130 selon le principe et le protocole décrit par Klein et al 1987 (Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sandford JC (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells NATURE vol 330, 1987).
- 35 3. Après le bombardement, les cellules sont transférées sur le même milieu de culture (2mg/l de N⁶-phosphométhyl)glycine.

Après 3 semaines de sélection sur ce milieu, des cals se développant sont
cellules puis amplifiés et analysés par PCR et révèlent clairement la présence du gène
chimère PTO-E1 SPS.

- 5 2ml - cellules non bombardées et mises en croissance sur le même milieu contenant
N(phosphométhylglycine) sont bloquées par l'herbicide et ne se développent pas.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour
l'obtention de lignées et d'hybrides ayant le caractère phénotypique correspondant à
l'expression du gène chimère introduit.

Description des constructions des plamides

- 1 pRPA-RD-124: Addition d'un signal de polyadénylation "nos" à pRPA-ML-720 avec
 5 création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS double mutant de maïs (Thr
 105 → Ile et Pro 106 → Ser). pRPA-ML-720 est digéré avec Hind III, traité avec le
 fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour produire une extrémité franche.
 On effectue une seconde digestion avec Nco I et le fragment EPSPS est purifié. Le gène
 EPSPS est ensuite ligué avec pRPA-RD-12 purifié (une cassette de clonage contenant le
 10 signal de polyadénylation de la nopaline synthase) pour donner pRPA-RD-124. Pour
 obtenir un vecteur pRPA-RD-12 purifié utile, il a fallu que celui-ci soit préalablement
 digéré avec Sph I, traité avec l'ADN polymérase de Klenow, puis digéré une seconde fois avec
 Nco I.
- 15 pRPA-RD-125: Addition d'un peptide de transit optimisé (PTO) à pRPA-RD-124 avec
 création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS ciblé sur les plasmides.
 pRPA-RD-7 (demande de brevet européen EP 652 286) est digérée avec Sph I, traité avec
 la T4 ADN polymérase, puis digérée avec Spe I et le fragment PTO est purifié. Ce
 fragment PTO est cloné dans pRPA-RD-124 qui a été préalablement digérée par Nco I,
 traité avec l'ADN polymérase de Klenow pour enlever la partie protubérante 3', puis
 20 digéré avec Spe I. Ce clone est alors séquencé pour assurer la fusion traductionnelle
 correcte entre le PTO et le gène d'EPSPS. On obtient alors pRPA-RD-125.
- pRPA-RD-130: Addition du promoteur d'histone de maïs H3C4 et de séquences
 d'enhancement dhl de pRPA-RD-123 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec
 création d'une cassette pour expression dans les plantes pour l'expression du gène d'EPSPS
 25 dirigée vers les tissus de monocotylédones. pRPA-RD-123 (une cassette contenant
 le promoteur d'histone de maïs H3C4 fusionné avec l'intron 1 adhl) est digérée avec Nco I
 et le fragment d'ADN contenant le promoteur dérivé de pRPA-RD-123 est ensuite
 ligué avec pRPA-RD-125, qui a été préalablement digéré avec Nco I et Sac I.
- 30 pRPA-RD-132: Addition du promoteur double d'histone de *Arabidopsis* H4A748
 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec création d'une cassette pour
 l'expression dans les plantes pour l'expression du gène "PTO- gène d'EPSPS double mutant"
 dirigée vers les tissus de monocotylédones. pRPA-RD-132 (une cassette contenant le promoteur
 d'histone H4A748 (demande de brevet EP 507 698)) est digérée avec Nco I et Sac I. Le
 fragment de promoteur est ensuite cloné dans qui a été digéré avec Eco I et Sac I.
- 35 pRPA-RD-159: Addition du gène "promoteur H4A748-PTO-gène d'EPSPS double
 mutant" dans plasmide pRPA-BL-150A (demande de brevet européen
 EP 507 698) pour créer un vecteur de transformation *Agrobacterium tumefaciens*. pRPA-

59 est digéré avec Not I et traité avec la polymérase de Klenow. Ce fragment est
cloné dans pRPA-BL-150A avec Sma I.

SEQUENCE LISTING

(i) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Lebrun, Michel
De Rose, Richard T
Sailland, Alain

(ii) TITLE OF INVENTION: 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate
synthase mutee, gene codant pour cette proteine et plantes
transformees contenant ce gene

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Francois Chretien
(B) STREET: 1420 rue Pierre Baizet
(C) CITY: Lyon Cedex 09
(E) COUNTRY: France
(F) ZIP: 69263

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(vii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Chretien, Francois

(viii) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (33)72-29-26-46
(B) TELEFAX: (33)72-29-28-43

INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1713 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(E) MOLECULE TYPE: cDNA

(ii) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Zea mays
(B) STRAIN: Black Mexican Sweet
(E) TISSUE TYPE: Callus

(iii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: lambda gt10
(B) CLONE: pRPA-ML-711

(iv) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ATG ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGGGGC CGGGCGGGTG	60
CGCC GGCACGGGCG GCGGCGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
AGCA CATCTGGC ACCGTCAAGC TGC CGGGGTC CAAGTCGCTT TCCAAACCGGA	180
TACT GCGCGCCCTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAACAGTG	240
AGCA TTAATCTCTC GGGGCTTGA GGAATCTTGG TCTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AGCA GAGGATGTA GTTGTGGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTT GAGGATGCTA	360
ATGTCAG GTTC TTGGGGAATG CTGGAACTGC AATGCGGCCA TTGACAGCAG	420
AGC AGCTGGTGA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480

ACCGAT TGGGACTTGG GTTGTGGGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT 540
 TGGGCAAT TGACTGCCCC CCGTTTCGTG TCAATGGAAT CCGAGGGGCTA CCTGGTGGCA 600
 TGAAGGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGGCTTGGTG ATGGCTGCTC 660
 TGGCTCT TGGGATGTG GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG 720
 ATTCAT ATTGAGATTG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT 780
 TGGCT CTACATTAAG GGAGGTCAAA AATACAAGTC CCCTAAAAAT GCCTATGTTG 840
 TGAAT CTCAGCGCA AGCTATTTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG 900
 GTGAA AGGTTGTGGC ACCACCAGTT TGCAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC 960
 ATCAT CCGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACTGTT ACTGGCCAC 1020
 TGAAGC ATTTGGGAGG AAACACCTCA AGGCGATTGA TGTCAACATG AACAAGATGC 1080
 TGTCC CATGACTCTT GCTGTGGTTG CCCTCTTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA 1140
 TTTTC TTCCTGGAGA GTAAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTTCGATC CCGACGGAGC 1200
 TGAAT CCGAGCATCT GTTGAGGAAG GCGCGGACTA CTGCATCATC ACGCGGCCGG 1260
 TTTTC CGTACGGCG ATCGACAGCT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT 1320
 TCCCT CTGTGCGAG GTCCCGTCA CCATCCGGGA CCTGGGTGTC ACCCGGAAGA 1380
 TCCCA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTCGTCAA GAATTAATAA AGCGTGGGAT 1440
 TACCG AGCTTGATTG AAGTGATAGG CTTGTGCTGA GGAATACAT TTCTTTTGT 1500
 TTTCT CTTTCAGGG ATTAAGTTTT GAGTCTGTAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG 1560
 TTTTC GATGCTAAG TTTGTGCACT GTAAGCCAAA TTTCAATTC AAGAGTGGTT 1620
 TTTT TAAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1680
 TTTT TAAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1713

SEQUENCE FOR SEQ ID NO:2:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 1340 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

(2) MOLECULE TYPE: cDNA

(3) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: Zea mays
 (B) STRAIN: Black Mexican Sweet

(4) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: pRPA-ML-716

(5) CLONING VECTORS:
 (A) VECTOR/KEY: CDS
 (B) POSITION: 6..1337

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

TGGGCAAT TGGGACTTGG GTTGTGGGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT 47
 Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile
 5 10
 TGAAGGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGGCTTGGTG ATGGCTGCTC 95
 Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile
 20 25 30
 TGAAGGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGGCTTGGTG ATGGCTGCTC 143
 Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile
 35 40 45
 TGAAGGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGGCTTGGTG ATGGCTGCTC 191
 Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile

	50	55	60	
1239	1239	1239	1239	1239
1287	1287	1287	1287	1287
335	335	335	335	335
383	383	383	383	383
431	431	431	431	431
479	479	479	479	479
527	527	527	527	527
575	575	575	575	575
623	623	623	623	623
671	671	671	671	671
719	719	719	719	719
767	767	767	767	767
815	815	815	815	815
863	863	863	863	863
911	911	911	911	911
959	959	959	959	959
1007	1007	1007	1007	1007
1055	1055	1055	1055	1055
1103	1103	1103	1103	1103
1151	1151	1151	1151	1151

	370	375	380	
ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC				1199
Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp				
385 390 395				
GAC GAC CAC AGG ATG GCC ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT				1247
Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys				
405 410				
ATC CCG GTC ACC ATC CCG GAC CCT GGG TGC ACC CCG AAG ACC				1295
Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr				
420 425 430				
GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT				1337
Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn				
435 440				
				1340

FORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 444 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) TOPOLOGY: linear

(2) MOLECULE TYPE: protein

(3) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly		
5 10 15		
Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu		
20 25 30		
Gla Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn		
35 40 45		
Asp Val Ile Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu		
55 60		
Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys		
70 75 80		
Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe		
85 90 95		
Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr		
100 105 110		
Gly Glu Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met		
115 120 125		
Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly		
135 140		
Ala Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val		
150 155 160		
Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser		
165 170 175		
Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala		
180 185 190		
Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro		
195 200 205		
Leu Met Tyr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala		
210 215 220		
Ser Asn Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys		
225 230 235 240		
Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala		
245 250 255		

Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 390 395 400
 Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 1340 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

(2) MOLECULE TYPE: cDNA

- (3) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: Zea mays
 (B) STRAIN: Black Mexican Sweet

(4) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: pRPA-ML-720

- (5) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 6..1337

(1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GGC GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
CTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 20 25 30	95
A GGC GGC GGC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
C AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
C CTC CTA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239

287	<p> CTT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Leu Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 85 90 </p>
335	<p> CTT GGT GGA AAT GCT GGA ATC GCA ATG CGG TCG TTG ACA GCA GCT Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 100 105 110 </p>
383	<p> CTT GGT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Leu Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125 </p>
431	<p> CTT GGT GGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Leu Gly Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140 </p>
479	<p> CTT GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155 </p>
527	<p> CTT GAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Leu Asp Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 165 170 </p>
575	<p> CTT GAT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Leu Asp Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 180 185 190 </p>
623	<p> CTT GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205 </p>
671	<p> CTT GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Leu Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220 </p>
719	<p> CTT GAT GTT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Leu Asp Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235 </p>
767	<p> CTT GAT CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Leu Asp Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 245 250 </p>
815	<p> CTT GAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Leu Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 260 265 270 </p>
863	<p> CTT GGT GGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Leu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285 </p>
911	<p> CTT GAT ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Leu Asp Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300 </p>
959	<p> CTT GAT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Leu Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 310 315 </p>
1007	<p> CTT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 325 330 </p>
1055	<p> CTT GAT GCT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Leu Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 340 345 350 </p>
1103	<p> CTT GAT AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Leu Asp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365 </p>
1151	<p> CTT GAT AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380 </p>
1199	<p> CTT GAT CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Leu Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395 </p>

1247 AG GAC GAC CAC AGG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys
 405 410
 1295 GTC GCG GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC
 Val Val Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr
 420 425 430
 1337 AG GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440
 1340

INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(a) LENGTH: 444 amino acids
 (b) TYPE: amino acid
 (c) TOPOLOGY: linear

(2) MOLECULE TYPE: protein

(3) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

1 Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 5 10 15
 2 Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 3 Lys Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 4 Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 5 Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 6 Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 7 Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 8 Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 9 Arg Ile Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 10 Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 11 Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 12 Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 13 Asp Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 14 Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 15 Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 16 Ser Ile Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 17 Phe Ile Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 18 Cys Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285

Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
295 300

Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
310 315 320

Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
325 330 335

Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
340 345 350

Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
375 380

Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
390 395 400

His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

REVENDECATIONS

- Une ADN codant pour une 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) caractérisé en ce qu'il comprend au moins une substitution Thréonine 102 → Isoleucine.
- Une ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en plus au moins une seconde mutation dans l'EPSPS, distincte de la première.
- Une ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constituée par une substitution Proline 106 par la Sérine.
- Une ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constituée par une substitution de la Glycine 101 par l'Alanine.
- Une ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine bactérienne.
- Une ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est issu d'une bactérie du genre *Escherichia coli*.
- Une ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine végétale.
- Une ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est d'origine de maïs.
- Une EPSPS mutée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine.
- Un chimérique comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, comme séquence codante, au moins une séquence selon l'une des revendications 1 à 8.
- Un chimérique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur d'un virus de plante.

Cène chimérique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend un facteur de plante (ex: α tubuline, histone, introns, actine...).

5 Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

10 Plante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par régénération à partir d'une cellule selon la revendication 14.

15 Procédé pour la production de plantes de tolérance améliorée à un herbicide ayant pour cible l'EPSP synthase, caractérisé en ce qu'on transforme des cellules végétales ou des plantes avec un gène selon l'une des revendications 1 à 8 et qu'on soumet les cellules transformées à une régénération.

20 Procédé de traitement des plantes avec un herbicide ayant l'EPSPS pour cible, caractérisé en ce qu'on applique l'herbicide à des plantes selon la revendication 15.

Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on applique du glyphosate ou un précurseur du glyphosate.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.